

Allein aufgrund der zeitlichen Reihenfolge der erhobenen Befunde läßt sich erkennen, daß es neben der ersten schockbedingten Störung des Aminosäure-Eiweißstoffwechsels eine zweite, anders geartete Störung dieses Stoffwechsels gibt. Nimmt man für die von uns während der zweiten Phase der Verbrennungskrankheit erhobenen Befunde nicht nur einen rein zeitlichen Zusammenhang an, so ist unseres Erachtens die einfachste Erklärung die, daß der erniedrigte Energiequotient die Ursache für die Störung des Aminosäure-Protein-Stoffwechsels ist. Ein erster Hinweis für die primäre Bedeutung des Energiestoffwechsels kommt von der Morphologie. Der häufigste pathologisch-anatomische Befund der Leber nach Verbrennung ist eine trübe Schwellung (7). Sie ist bedingt durch eine Quellung der

Mitochondrien und damit morphologisches Substrat der Energiestoffwechselstörung (17). Eine weitere Bestätigung erfährt unsere Annahme durch die Befunde von KOEHN (18). Er fand als Ausdruck einer Zerstörung von Enzymen der Atmungskette eine Abnahme der Flavinnucleotide in der Leber nach Verbrennung. Pathogenetische Zusammenhänge zwischen den beobachteten Stoffwechselstörungen, nicht bakteriellen Toxinen und häufig therapieresistenten Infekten sind vorstellbar, aber bisher ungeklärt.

Fräulein G. JUNGELODT danken wir für ihre fleißige und gewissenhafte Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche. Ein weiterer Dank gilt Herrn Gewerbeobermedizinalrat Dr. TH. PETERS für seine wohlwollende Unterstützung unseres Forschungsprogramms.

### Literatur

1. MÜLLER, F. E., Med. Klinik 60, 636 (1965). — 2. REHN, J. und L. KOSLOWSKI, Praktikum der Verbrennungskrankheit, Vorträge aus der praktischen Chirurgie, 57. Heft Ferdinand Enke, Verlag, Stuttgart (1960). — 3. RÜENAUVER, R., H. KRÖNER und W. STAIB, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 331, 143 (1963). — 4. KRÖNER, H. und R. RÜENAUVER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 227 (1964). — 5. ARTURSON, G., Acta chir. Scand. 128, 25 (1964). — 6. REHN, J., Langenbeck's Arch. Klin. Chir. 290, 466 (1959). — 7. ALLGÖWER, M. und J. SIEGERIST, Verbrennungen, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1957). — 8. LINDLAR, F. und H. BERGER, Schweiz. med. Wschr. 92, 110 (1962). — 9. ZENKER, N. und D. E. BERNSTEIN, J. biol. Chemistry 231, 695 (1958). — 10. MOORE, S. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 176, 367 (1948). — 11. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN und S. MOORE, Analytic. Chem. 30, 1190 (1958). — 12. PFEIFFER, E. F., W. E. VAUBEL, K. RETIENE, D. BERG und H. DITSCHUNEIT, Klin.

Wschr. 38, 980 (1960). — 13. LAMPRECHT, W. und I. TRAUTSCHOLD, In Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962). — 14. FRIEDBERG, F. und D. M. GREENBERG, J. biol. Chemistry 168, 405 (1947); BONDY, P. K., Endocrinology 45, 605 (1949); INGLE, D. J., M. C. PRESTRUD und J. E. NEZAMIS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 75, 801 (1950); KAPLAN, S. A. und C. S. NAGAREDA SHIMIZU, Endocrinology 72, 267 (1963). — 15. ENGEL, F. L., M. G. WINTOU und C. N. H. LONG, J. Exper. Med. 77, 397 (1943). — 16. ENGEL, F. L., Ann. N. Y. Acad. Sci. 55, 381 (1952); Metabolic aspects of hemorrhagic and traumatic shock. 2. Conf. on Shock and Circulatory Homeostasis. Josiak Macy jr. Foundation, New York 1952. — 17. BÜCHNER, F., Allgemeine Pathologie, 2. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin (1956). — 18. KOEHN, C. J., Ann. Surg. 158, 933 (1963).

Professor Dr. W. Staib, 4 Düsseldorf, Witzelstraße 111

## Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

### I. Mitteilung: Beschreibung der Methode<sup>1)</sup>

Von L. TREIBER und G. W. OERTEL

(Aus der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie, Institut für Hygiene und Mikrobiologie,  
Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar)

(Eingegangen am 20. Juni 1966)

Für die qualitative und quantitative Bestimmung von Ketosteroiden eignet sich ihre Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin in abs. Benzol/Trichloressigsäure. Die gebildeten 2,4-Dinitrophenylhydrazone von  $C_{21}$ -,  $C_{19}$ - und  $C_{18}$ -steroiden mit Ketogruppen u. a. in C-3, C-17 oder C-20 werden mittels Dünnschichtchromatographie abgetrennt und photometriert. Hierbei hängen Wellenlänge des Absorptionsmaximums (360–390 m $\mu$ ) und molarer Extinktionskoeffizient ( $\epsilon = 22000$ –52000) von Zahl und Stellung der Ketogruppen ab. Die vorliegende Methode gestattet die Erfassung von 0,1  $\mu$ g Monoketosteroid in 1 ml Endlösung mit ausreichender Richtigkeit und Genauigkeit.

The reaction of oxo-steroids with 2,4-dinitrophenylhydrazine in absolute benzene/trichloroacetic acid may be employed for their qualitative and quantitative determination. The 2,4-dinitrophenylhydrazones of  $C_{21}$ -,  $C_{19}$ -, and  $C_{18}$ -steroids with oxo groups in position C-3, C-17 or C-20, are separated by thin layer chromatography and measured photometrically. The absorption maximum (360–390 m $\mu$ ) and the molar extinction coefficient ( $\epsilon = 22,000$ –52,000) depend on the number and position of the oxo groups. With the present assay, it is possible to determine 0.1  $\mu$ g of a mono-oxo-steroid in 1 ml of final solution with sufficient accuracy and precision.

Obgleich sich die Zimmermann-Reaktion als Nachweis von 17-Ketosteroiden in qualitativen und quantitativen Untersuchungen hinlänglich bewährt hat, so fehlt ihr doch die Empfindlichkeit, wie sie z. B. zur Bestimmung vorgenannter  $C_{19}$ -steroiden in geringen Plasmavolumina erforderlich ist. Es lag infolgedessen nahe, anstelle der

<sup>1)</sup> Vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt.

zwar spezifischen Zimmermann-Reaktion die weitaus empfindlichere Umsetzung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zur quantitativen Erfassung derartiger Verbindungen heranzuziehen, zumal die Beständigkeit der gebildeten Derivate und ihre intensive Farbe sowohl die Handhabung, wie auch eine etwaige chromatographische Isolierung erleichtern sollte. Aufbauend auf den grundlegenden Untersuchungen von

REICH und Mitarbeitern (1, 2, 3) wurde daher die nachstehende Methode zum quantitativen Nachweis von Ketosteroiden entwickelt.

### Methodik

Der bis zu 0,1  $\mu\text{Mol}$  Ketosteroid enthaltende Rückstand wird mit 0,05 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat unter Stickstoff bei 35–40° zur vollkommenen Trockene gebracht. Anschließend löst man den Rückstand in 1,0 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol und dampft nach 30 Min. bei 35–40° im Stickstoffstrom (Luftstrom) zur Trockene ein. Der Rückstand wird in wenig Chloroform aufgenommen und quantitativ auf eine Dünnschichtplatte mit aktiviertem Kieselgel G (0,3 mm) überführt. In gleicher Weise werden zu beiden Seiten der Probe jeweils 5  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazons als Standard aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt in Chloroform-Äthanol (19:1 v/v) oder Benzol-Dioxan (8:2 v/v). Beide Lösungsmittel gestatten die einwandfreie Abtrennung überschüssigen Reagenzes von dem gesuchten Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazon. Der dem Standard entsprechende Farbfleck wird festgelegt, das Kieselgel abgekratzt und zweimal mit je 5 ml Chloroform eluiert. Man dampft die Lösung unter Stickstoff bei 35–40° zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in 3,0 ml Chloroform auf und photometriert die Lösung bei den in Tabelle 1 zusammengestellten Wellenlängen, die für den jeweiligen Steroidtyp charakteristisch sind. Zwecks Eliminierung der unspezifischen Absorption wird die maximale Absorption von Probe und Standard gemäß nachstehender Formel in üblicher Weise korrigiert und der Gehalt der Probe an gesuchtem Steroid durch Vergleich der Werte ermittelt:

$$\text{Abs}_{\text{max kor.}} = 2 \times \text{Abs}_{\text{max}} - \text{Abs}_A - \text{Abs}_B$$

### Ergebnisse und Diskussion

Gegenüber der zumeist in Äthanol/Salzsäure durchgeführten Reaktion von Keton und 2,4-Dinitrophenylhydrazin (4, 5, 6) erwies sich die hier angegebene Verwendung von Benzol/Trichloressigsäure als überlegen. Versuche mit steigenden Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Abb. 1) und Trichloressigsäure (Abb. 2) zeigten, daß bei Vorliegen einer einzigen Ketogruppe bereits zwei Äquivalente Reagenz genügen, um in Gegenwart von katalytisch wirksamen Säuremengen eine vollständige Umsetzung des Steroids zu erzielen.

Was die Temperaturabhängigkeit angeht, so ließen sich schon nach 10 Min. bei Zimmertemperatur 96% des

eingesetzten Steroids in Form des 2,4-Dinitrophenylhydrazons isolieren (Abb. 3). Eine wesentliche Rolle dürfte hier das Eindampfen des Reaktionsgemisches im Stickstoffstrom darstellen, da durch die azeotrope Entfernung entstehenden Wassers das Reaktionsgleichgewicht offenbar ständig zur Seite des Reaktionsproduktes hin verschoben wird.

Mag die Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches auch als zusätzlicher und vielleicht umständlicher Schritt angesehen werden, so bietet sie doch den Vorteil einer einfachen und leicht kontrollierbaren Abtrennung des gesuchten Derivats und erhöht zugleich die Spezifität des Verfahrens (6).

Die Empfindlichkeit der Bestimmung, die naturgemäß von dem molaren Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazons (Tab. 1) abhängt, beträgt in der vorliegenden Ausführung rund 0,25  $\mu\text{g}$  gesättigtes Mono-17-ketosteroid (Androsteron). Bei 10 Wiederauffindungsversuchen (Tab. 2) mit je 2,0  $\mu\text{g}$   $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -Dehydroepiandrosteron konnten  $97 \pm 4\%$  der eingesetzten Radioaktivität (12600 dpm) in den entsprechenden Fraktionen des 2,4-Dinitrophenylhydrazons nachgewiesen werden. Zehn Einzelbestimmungen von 1,0  $\mu\text{g}$  Androsteron (Tab. 2) führten zur Wiederauffindung von  $0,96 \pm 0,06 \mu\text{g}$  Steroid, was die Genauigkeits-Bedingungen, die an eine Methode zu stellen sind, weitgehend erfüllt. Die Spezifität des Verfahrens beruht auf der bekannten Reaktion von 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit Ketogruppen in saurer Lösung. Von den bei  $\text{C}_{18}$ -,  $\text{C}_{19}$ - und  $\text{C}_{21}$ -steroiden anzutreffenden Ketogruppen reagiert nur die 11-Ketogruppe nicht. Für eine größere Spezifität sorgt vor allem die Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches, die einen Vergleich chromatographischer Eigenschaften von Probe und Standard in Form des 2,4-Dinitrophenylhydrazons ermöglicht. Die  $R_F$ -Werte einer Reihe von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Der Charakterisierung gebildeter Derivate diene weiter die Untersuchung von Absorptionsmaximum und

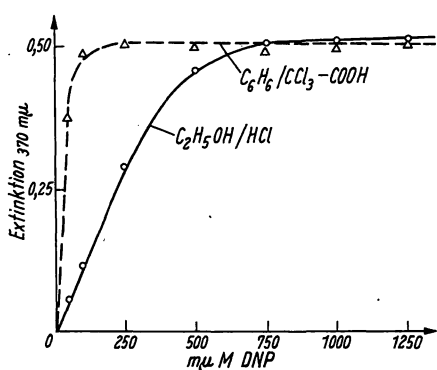


Abb. 1. Reaktion von 50  $\mu\text{Mol}$  Androsteron mit steigenden Konzentrationen an 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Gegenwart von 1000  $\mu\text{Mol}$  Trichloressigsäure in abs. Benzol ( $\Delta$ — $\Delta$ ), bzw. von 200  $\mu\text{Mol}$  Salzsäure in Äthanol ( $\circ$ — $\circ$ ). Reaktionsdauer: 2 Std. bei 70°

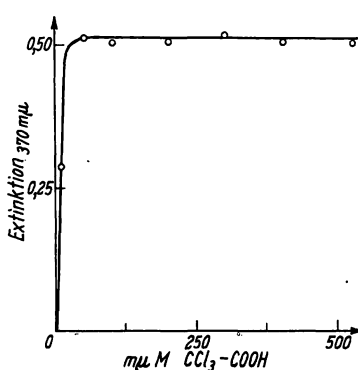


Abb. 2. Reaktion von 50  $\mu\text{Mol}$  Androsteron mit 200  $\mu\text{Mol}$  2,4-Dinitrophenylhydrazin in abs. Benzol bei steigenden Konzentrationen an Trichloressigsäure. Reaktionsdauer: 2 Std. bei 70°

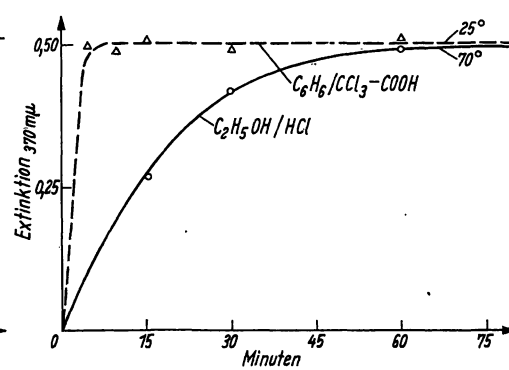


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Reaktion von 50  $\mu\text{Mol}$  Androsteron mit 200  $\mu\text{Mol}$  2,4-Dinitrophenylhydrazin in abs. Benzol und Gegenwart von 200  $\mu\text{Mol}$  Trichloressigsäure ( $\Delta$ — $\Delta$ ), bzw. in Äthanol und Gegenwart von 200  $\mu\text{Mol}$  Salzsäure ( $\circ$ — $\circ$ ). Reaktionstemperatur: 25° bzw. 70°

Tab. 1  
Angabe der Wellenlängen für die Photometrie der verschiedenen 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Ketosteroiden

Derivat von	Absorption in m $\mu$		
	A	Maximum	B
nicht-konjug. 3- oder 17-Ketonen	335	370	405
20-Ketonen	340	375	410
$\Delta^4$ -3,17-Diketonen	345	380	415
$\Delta^4$ -3,20-Diketonen	350	385	420
$\Delta^4$ -3-Ketonen	355	390	425

Tab. 2  
Wiederauffindungsversuche mit 2,0  $\mu$ g  $7\alpha$ - $^3$ H-Dehydroepiandrosteron („DHEA“) und 1,0  $\mu$ g Androsteron („ANDRO“)

	DHEA 2,0 $\mu$ g = 12600 dpm	ANDRO 1,0 $\mu$ g
11720		0,92
12580		0,99
11470		0,97
12610		0,86
12220		1,01
11850		0,99
12870		0,98
11840		0,90
12330		0,91
12710		1,03
M	12220 = 97 %	0,96
s	460 = 4 %	0,06

Tab. 3  
 $R_F$ -Werte verschiedener Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazone

2,4-Dinitrophenylhydrazon von	$R_F$ -Wert in System		
	1	2	3
3 $\beta$ -Hydroxy-androst-5-en-17-on	0,59	0,37	0,45
3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	0,68	0,50	0,54
3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on	0,64	0,42	0,50
3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	0,55	0,36	0,43
3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on	0,52	0,33	0,40
3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-11,17-dion	0,63	0,38	0,44
3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -androstan-11,17-dion	0,61	0,34	0,41
5 $\alpha$ -Androstan-3,17-dion	0,87	0,82	0,75
5 $\beta$ -Androstan-3,17-dion	0,85	0,81	0,73
17 $\beta$ -Hydroxy-androst-4-en-3-on	0,65	0,41	0,51
Androst-4-en-3,17-dion	0,87	0,79	0,74
11 $\beta$ -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion	0,79	0,73	0,66
Androst-4-en-3,11,17-trion	0,86	0,75	0,70
3 $\beta$ -Hydroxy-pregn-5-en-20-on	0,61	0,39	0,48
3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-pregn-5-en-20-on	0,53	0,28	0,39
3 $\beta$ ,21-Dihydroxy-pregn-5-en-20-on	0,60	0,32	0,36
11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3,20-dion	0,57	0,15	0,31
3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on	0,12	0,04	0,06
Pregn-4-en-3,20-dion	0,88	0,83	0,74
17 $\alpha$ -Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	0,77	0,68	0,69
21-Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	0,74	0,54	0,55
11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	0,64	0,32	0,40
11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-Trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	0,60	0,22	0,35
Reagenz	0,35	0,12	0,27

Lösungsmittelsystem: 1 = Chloroform-Äthanol (19:1 v/v) auf Kieselgel G  
2 = Cyclohexan-Butylacetat-Butanol (50:45:5 v/v) auf Aluminiumoxyd G  
3 = Benzol-Dioxan (8:2 v/v) auf Kieselgel G

Tab. 4. Absorptionsmaximum und molarer Extinktionskoeffizient verschiedener Ketosteroid-2,4-dinitrophenylhydrazone

Steroidgruppe	Verbindung (DNPH) <sup>a)</sup>	Absorptionsmaximum (m $\mu$ )	Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon$
Mono-ketone	17 $\beta$ -Hydroxy-androstan-3-on	369	22600
	3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	370	23600
	3 $\beta$ -Hydroxy-pregn-5-en-20-on	374	24100
	17 $\beta$ -Hydroxy-androst-4-en-3-on	390	31000
Di-ketone	5 $\alpha$ -Androstan-3,17-dion	370	40700
	5 $\beta$ -Pregnan-3,20-dion	373	41400
	Androst-4-en-3,17-dion	381	54200
	Pregn-4-en-3,20-dion	384	50800
Tri-ketone	17 $\alpha$ ,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,11,20-trion	383	52400

<sup>a)</sup> DNPH = Mono- oder Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon.

molarem Extinktionskoeffizienten der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Vertretern verschiedener Steroidgruppen (Tab. 4). Hiernach wiesen die 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Steroiden mit isolierter Ketogruppe im Ringsystem (C-3 oder C-17) ein Absorptionsmaximum bei 369–370 m $\mu$  und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 22600–24100 auf — in Übereinstimmung mit entsprechenden Daten für Cyclohexanon- und Cyclopentan-2,4-dinitrophenylhydrazon ( $\epsilon$  = 23000 bei 370 m $\mu$ ). Bei Anwesenheit einer Keto-gruppe in der Seitenkette (C-20) verschob sich lediglich das Absorptionsmaximum des 2,4-Dinitrophenylhydrazons auf 373–374 m $\mu$ . Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone konjugiert ungesättigter Monoketone ( $\Delta^4$ -3-Ketone) besaßen ein Absorptionsmaximum bei 390 m $\mu$  mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 31000–32500. Enthielten derartige Steroide eine zusätzliche Keto-gruppe in C-17 oder C-20, so beobachtete man im Absorptionsspektrum des jeweiligen Bis-2,4-dinitrophenylhydrazons ein breiteres Maximum bei 380 bis 381 m $\mu$ , bzw. bei 383–384 m $\mu$ , welches der sich über-

lagernden Absorption beider 2,4-Dinitrophenylhydrazon-gruppen zuzuschreiben ist. Der zugehörige molare Extinktionskoeffizient bewegte sich zwischen 50800 und 52400 und dürfte daher die Summe der molaren Extinktionskoeffizienten von isolierter und konjugierter Ketogruppe (C-17 oder C-20:  $\epsilon$  = etwa 22000;  $\Delta^4$ -3-Ketogruppe:  $\epsilon$  = etwa 32000) darstellen. In gleicher Weise addieren sich die molaren Extinktionskoeffizienten der 2,4-Dinitrophenylhydrazone isolierter Keto-gruppen in Diketo-steroiden (3,17-Diketone oder 3,20-Diketone), deren Summe 40000–42000 betrug. Aus der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen und ihrer chromatographischen Beweglichkeit in den angegebenen Systemen lassen sich somit auch Rückschlüsse auf die Lage von Ketogruppen im Steroidmolekül ziehen.

Über die Anwendung der hier beschriebenen Methode zur Bestimmung von 17-Ketosteroiden in peripherem menschlichen Plasma oder zum Nachweis von Ketosteroiden in geringen Harnvolumina wird an anderer Stelle berichtet.

## Literatur

1. REICH, H., D. H. NELSON und A. ZAFFARONI, J. biol. Chemistry 187, 411 (1950). — 2. REICH, H., K. F. CRANE und S. F. SANFILIPPO, J. org. Chem. 18, 822 (1953). — 3. REICH, H. und B. K. SAMUELS, J. org. Chemistry 19, 1041 (1954). — 4. NEHER, R., J. Chromatogr. (Amsterdam) 1, 122 u. 205 (1958). — 5. KOCHAKIAN, C. D. und G. STIDWORTHY, J. biol. Chemistry 199, 607 (1952). — 6. STUPNICKI, R. und E. STUPNICKA, Nature 200, 165 (1963).

Dozent Dr. G. W. Oertel  
65 Mainz, Langenbeckstraße 1

## Glutaminbestimmung in Serum und Liquor cerebrospinalis mit Glutaminase

VON H. KLUGE, H. HERMANN und V. WIECZOREK

Aus der Klinik für Psychiatrie und Neurologie „Hans Berger“ der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
(Direktor: Prof. Dr. v. Keyserlingk)

(Eingegangen am 4. Juli 1966)

Es wird eine Methode zur Glutaminbestimmung in Sera und Liquores beschrieben. Sie basiert auf der Glutaminspaltung durch Glutaminase und anschließender Ammoniakbestimmung mit Phenol-Hypochlorit-Reagenz. Die Gewinnung der Glutaminase erfolgte auf einfachem Wege aus Schweinenierenmitochondrien. Die Fermentpräparate waren frei von ammoniak-abspaltenden Enzymen. Durch entsprechende Variation der Reaktionsbedingungen können 0,8–20 µg Glutamin pro Testansatz bestimmt werden.

A method is described for the determination of glutamine in serum and cerebrospinal fluid. It is based on the hydrolysis of glutamine with glutaminase, followed by the determination of ammonia with phenol-hypochlorite reagent. Glutaminase is obtained by a simple method from pig liver mitochondria; the enzyme preparations were free from other enzymes that release ammonia. By appropriate variations of the reaction conditions, it is possible to measure 0.8–20 µg of glutamine per sample.

Die zahlreichen Funktionen des Glutamins im Stoffwechsel zeigen dessen große Bedeutung und bedingen gleichzeitig das ständig steigende klinische Interesse. Vor unseren Untersuchungen über den Glutaminstoffwechsel war zunächst die Ausarbeitung einer brauchbaren schnellen und vor allem spezifischen Methode zur Glutaminbestimmung erforderlich.

Die bisher beschriebenen Analysenverfahren benutzen die chromatographische Auftrennung, den chemischen Nachweis und die quantitative chemische oder enzymatische Bestimmung der Glutaminspaltprodukte nach enzymatischer Einwirkung. So ermittelte GEROK (1) den Glutamingehalt des Serums neben anderen Aminosäuren nach Elutionschromatographie an Ionenaustauschern. Ebenfalls mit Austauschchromatographie arbeiteten KNAUFF und Mitarbeiter (2). WAELSCH und Mitarbeiter (3–6) trennten das Glutamin aus Aminosäuregemischen an Dowex-Säulen ab. Die Austauschchromatographie hat den Nachteil, daß Asparagin nicht von Glutamin zu trennen ist und außerdem Serin interferiert (2). Weiterhin ist das Verfahren sehr zeitaufwendig und mit erheblichen Glutaminverlusten verbunden.

Neben der Austauschchromatographie wurden auch papierchromatographische Verfahren verwendet. KNAUFF und Mitarbeiter (7) beschreiben die Bestimmung des Glutamins auf diese Weise neben 20 weiteren Plasmaamino-säuren. Die Autoren geben gleichzeitig eine erschöpfende Literaturübersicht. Die Papierchromatographie ist aber ebenso zeitaufwendig und setzt wie alle bisherigen chromatographischen Verfahren eine Enteiweißung des Untersuchungsgutes voraus. Dadurch wird das Glutamin über eine erhebliche Zeit stark sauren Bedingungen ausgesetzt, die sicher Verluste bedingen. Den chromatographischen Verfahren dürfte die Be-

stimmung der Spaltprodukte des Glutamins nach dessen enzymatischer Spaltung eindeutig überlegen sein. So nutzten NAIJAR und FISCHER (8) den Decarboxylasegehalt des Acetontrockenpulvers von *Escherichia coli* aus, um nach enzymatischer Decarboxylierung einer Reihe von Aminosäuren aus einem Gemisch das Glutamin durch Differenzbildung zu bestimmen.

Waren die letzten beiden Methoden nur indirekte, so bedienten sich MEISTER und Mitarbeiter (9, 10, 11), TOWER und Mitarbeiter (12, 13), CONWAY (14), KREBS (15) sowie ZYDOWO (16) direkter Verfahren. TOWER beschreibt die Glutaminbestimmung mit Glutaminasehaltigen Extrakten aus *Clostridium perfringens (welchii)*. Das Enzym spaltet Glutamin in Glutaminsäure und Ammoniak. Beide Spaltprodukte können leicht quantitativ bestimmt werden. Zur Glutaminsäurebestimmung wird neben der enzymatischen Methode hauptsächlich das Hydroxamsäureverfahren herangezogen (17, 18). In dieser Arbeit wird ebenfalls eine enzymatische Methode beschrieben. Wir präparierten auf einfache Weise in Anlehnung an die Methoden von KLINGMAN und HANDLER (19) und SAYRE und ROBERTS (20) eine genügend aktive und von Fremdaktivitäten freie Glutaminase. Das freigesetzte Ammoniak wurde mit einer etwas modifizierten Technik in Anlehnung an das Verfahren von BERTHELOT (21) bestimmt.

## Methodik

## Glutaminasepräparation

Frische Schweineniere wurde bei 0° im Fleischwolf zerkleinert und mit 5 Volumenteilen 0,25M Rohrzuckerlösung (0,02M an Boratpuffer; pH 8,1) im „Starmix“ homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte bei 0° während 15 Min. mit mehreren Abkühlungspausen. Das Homogenat wurde 10 Min. bei 3000–3500 g zentrifugiert und das Sediment verworfen. Es enthält Bindegewebsreste, Zellkerne